



论文

肝脏特异性表达分泌型 IgD 转基因小鼠模型的构建

王萍^①, 位治国^②, 焉博文^①, 黄甜^①, 苟克勉^①, 戴蕴平^①, 郑敏^①, 王美丽^①,
程学谦^①, 王喜凤^①, 许晨^①, 孙亿^{①*}

① 中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;

② 河南科技大学动物科技学院, 河南 471003

* 联系人, E-mail: sunyi@cau.edu.cn

收稿日期: 2011-11-17; 接受日期: 2012-03-02

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB945300)资助项目

摘要 现有的遗传学研究认为高 IgD 综合征(HIDS)与甲羟戊酸激酶(MVK)基因发生突变有关, 但具体的发病机制还不清楚, 血清中 IgD 的升高与 HIDS 临床表征之间的关系还不知道. 本研究运用融合 PCR 的方法构建肝脏特异性高表达嵌合分泌型 IgD(csIgD)载体, 并通过显微共注射, 基因组 PCR 和 Southern blotting 鉴定出 7 只转基因 F₀ 代阳性小鼠. 对 F₁ 代阳性小鼠在 RNA 和蛋白质水平分别进行了 RT-PCR, Q-PCR 和 Western blotting, ELISA 检测. 结果显示, 转基因 csIgD 能够在肝脏特异性表达, 并具有遗传稳定性. 对阳性小鼠骨髓和脾脏细胞进行的流式分析发现, 转基因 csIgD 的表达并未影响到 B 细胞的发育. 形态解剖学观察, 发现一些小鼠出现了皮肤破损和肝脾肾肿大的现象; 病理切片显示, 肝脾肾组织出现大量的细胞坏死和纤维样蛋白沉淀. TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)检测结果表明, 目的基因片段没有破坏位于小鼠 5 号染色体的 MVK 基因. 本转基因小鼠模型的构建, 有利于进一步对 HIDS 发病机制进行探讨.

关键词

sIgD

肝脏特异性表达载体

HIDS MVK

高 IgD 综合征(hyper-immunoglobulin D syndrome, HIDS), 也称周期性发热综合征(receptor associated periodic syndrome, RAPS), 也曾称为变异型 Still 病或还原尿睾酮热(etiocholanolone fever)等. 该病是以血清 sIgD 浓度升高, 同时伴随周期性高热、关节炎、淋巴结肿大、肝脾肿大和皮肤破损等临床表征的综合征^[1~3]. 此外, 还有部分病人同时会伴有 IgA 的升高和 TNF- α 的增加^[4]. HIDS 病人中白介素 IL-1 β 分泌增高也可能与甲羟戊酸激酶(MVK)缺乏时类异戊二烯

代谢终产物短缺有关^[5]. 该病症首先由 Vander Meer 等人^[6]于 1984 年在荷兰的 6 位病人中发现, 并以发病的特征来命名.

Drenth 等人^[7]对来自荷兰(8)、法国(5)、英国(1)、西班牙(1)及捷克(1)5 个国家的 16 个 HIDS 家族中的 34 个病人和 44 个正常人进行了全面的诊断和实验分析, 结果发现 MVK 基因发生了错义突变, 致 MVK 活性降低. 同时, 该研究对 HIDS 病人成纤维细胞中 MVK 活性降低进行了功能分析, 推断 MVK 基因的

突变可能是导致 HIDS 的原因. 此后的一些研究也证明 HIDS 中 MVK 基因发生了突变或缺失^[8,9]. MVK 是胞质中的一种蛋白酶, 与胆固醇和非固醇异戊二烯的合成有关. 人 MVK 基因定位于 12q24, 最常见的突变位于 377 位, 在此处的缬氨酸被异亮氨酸替代(V377I). 大约每 5 名 HIDS 患者中就有 1 名纯合子 V377I 突变, 余多为其杂合子; 其次为 I268T 突变^[10,11].

Hanger^[12]研究发现, MVK 基因单敲小鼠的血清中 sIgD 的含量明显升高, 同时还伴有 IgA 和 TNF- α 的增加, 临床表现为发热和肝脾肿大. 但是, Ammouri 等人^[13]对 50 个疑似 HIDS 临床表征病人的研究发现, 38 个血清 sIgD 增高的病人中, 只有 19 人发生了 MVK 的突变, 这似乎表明 sIgD 在 HIDS 的临床表征上具有决定性作用. sIgD 的具体功能还不清楚, 研究发现其能结合抗原微生物以及他们的产物. 在接触性皮炎病人的初期炎症反应中, sIgD 能够诱导骨髓细胞的渗透, 主要是中性粒细胞、少量的嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞向皮肤的迁移^[14]. 此外, 嗜碱性粒细胞与 sIgD 的偶联, 能够诱导抗菌因子和 B 细胞激活因子的释放. Chen 等人^[15]研究表明, sIgD 是一个重要的免疫调理分子, sIgD 能够通过诱导与其相互作用细胞的激活、组织间的渗透和免疫激活因子的释放等途径来增强免疫防御. 然而, 过度的激活途径会导致炎症反应和组织的破坏. 不同的 HIDS 病人, 血清中 sIgD 增加的程度也有很大差异^[16].

HIDS 最初见于西欧白人, 现在世界各地都有病例报道, 包括近邻的日本^[17,18]. 然而, 迄今为止 HIDS 的具体发病机制还不清楚, 也没有发现针对性药物. 那么, sIgD, MVK 及炎症反应三者之间的关系是什么? 是血清 sIgD 的升高直接导致的炎症反应, 还是 MVK 的突变导致其他通路引起的炎症反应呢? 为了探讨这个问题, 本研究构建了肝脏特异性表达 sIgD 的转基因小鼠模型.

1 材料与方法

1.1 表达载体的构建

(1) 血清白蛋白(ALB)启动调控序列的获得. 提取昆明小白鼠(购自国家计划生育研究所动物部)肝脏基因组 DNA, 分别设计引物 PCR 扩增得到 1.97 kb

的 ALB 增强子(enhancer)序列^[19]和 412 bp 的 ALB 启动子(promotor)序列^[20,21]. 扩增 en-ALB 序列用的引物是: en-ALB-F(5'-AAAACGCGTATTTGAATACACACTTTTGTTCATG-3')和 en-ALB-R(5'-AGGTTGTTTCATCCCAAAGTTATCAATCAAAGCAG-3'). 其中, 下划线序列为 *Mlu* I 酶切位点序列, 5'端 4 个 A 为酶切位点保护碱基. 运用融合 PCR(fusion PCR)的方法将 ALB 的增强子和启动子序列融合成长约 2.35 kb 的 ALB 启动调控序列(en-p ALB), 引物是: en-ALB-F 和 p-ALB-R.

(2) 目的基因片段的获得. 提取昆明小白鼠脾脏总 RNA, 反转录为 cDNA. 以 cDNA 为模版, 分别扩增 sIgD 重链(H)和 Kappa 轻链(K)的恒定区(C)序列. 扩增 IgDHC 所用的引物是: IgDHC-F(5'-CTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGATAAAAAGGAACCTGAC-3')和 IgDHC-R(5'-TTTTGCGGCCGCTCAGGCAAGGGCAGGACCA-3'), 所得片段长度为 803 bp. 扩增 KC 所用的引物是: KC-F(5'-CAAGCTCGAGATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC-3')和 KC-R (5'-TTTTGCGGCCGCTAACAACCTC ATTCTGTG-3'), 所得片段长度为 348 bp. 以上引物中, 下划线序列为 *Not* I 酶切位点序列, 4 个 T 为酶切位点保护碱基.

分别从本实验室保存的编码抗人甲肝病毒(HAV)的单克隆抗体 IgG1 重链和轻链序列的质粒 pHAVH3 和 pHAVL3 中, 扩增 IgG1 H 和 K 可变区(V)的 CDS 序列. 扩增 IgGHV 所用的引物是: IgGHV-F(5'-TTTTGAATTCAGCATGGGTGACAATGACATCCAC-3')和 IgGHV-R(5'-GTTCTTTTATCACCTGAGGAGACGGTGACC-3'), 所得片段长度为 450 bp. 下划线序列为 *Eco*R I 酶切位点序列, AGCATGG 为 Kozak 序列, 4 个 T 为酶切位点保护碱基. 扩增 KV 所用的上游引物同样是 IgGHV-F, 下游引物是 KV-R(5'-GTTGGTGCAGCATCAGCCCGTTTGATCTCGAGCTTG-3'), 所得片段长度为 410 bp.

同样用 Fusion PCR 的方法得到嵌合 sIgD H 和 K 全长 CDS 序列. csIgDH 所用引物为 IgGHV-F 和 IgDHC-R, 得到序列长度为 1214 bp. cKappa 所用引物为 IgGHV-F 和 KC-R, 得到序列长度为 722 bp.

(3) 肝脏特异性表达载体(en-pALB-csIgDH/cKappa)的构建. 首先将 csIgDH, cKappa 和 pcDNA3.1 (+)(实验室保存)分别用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收大片段. 在 T4 连

接酶的作用下, 将 csIgDH 和 cKappa 分别插入到 pcDNA3. 1(+) 的多克隆位点, 得到分别含有 H 和 K 的广谱表达载体. 然后将这两个表达载体和 en-pALB 分别用 *Mlu* I 和 *Nhe* I 进行酶切、电泳, 切胶回收大片. 同样在 T4 连接酶的作用下, 将 pcDNA3. 1(+) 的 CMV 启动子换成 en-pALB 启动调控序列构建成分别含有 csIgDH 和 cKappa 的肝脏特异性表达载体. 以上所用限制性内切酶均购于 TaKaRa 公司.

1.2 转基因小鼠的制备

用 *Mlu* I 和 *Nae* I 将 en-pALB-csIgDH/cKappa 双酶切, 分别含有 csIgDH(4059 bp) 和 cKappa(3567 bp) 的目的片段. 目的片段含有 en-pALB, T7 启动子, 牛生长激素聚腺苷酸序列(BGH pA) 和目的片段 csIgDH 或 cKappa(图 1). 这两个目的基因片段经过琼脂糖凝胶电泳(Omega, USA)纯化回收, 根据标准操作, 以 1:1 的摩尔比率, 共同注射到昆明白小鼠原核受精卵中. 提取小鼠尾部基因组 DNA, 转基因 PCR 鉴定, 引物是 p-ALB-F 和 en-pALB-R(5'-AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAG-3'). 上游引物在启动调控序列, 下游引物位于 BGH pA, 所以能够同时检测重链和轻链基因. 基因组 DNA(10 μ g) 经 *Dra* I 限制性内切酶消化, 以 DIG 标记的 csIgDH 和 cKappa 全长为探针, 进行 Southern Blotting 分析.

1.3 RT-PCR 和实时定量 PCR

用 Trizol(CWBIO, CN) 提取不同家系阳性小鼠肝

脏总 RNA, RNA 浓度使用 NanoDrop(Thermo, USA) 测定. 取 2 μ g 总 RNA 用 M-MLV 反转录酶(Promega, USA) 合成的 cDNA. 目的基因表达检测引物, 上游位于可变区, 下游位于恒定区. csIgDH 检测引物是: HV-HC-F(5'-GTCAGGTACAACATATGGTGTC-3') 和 HV-HC-R(5'-CAAGTGTGGTTGAGGTTTCAGT-3'), 所得片段长度为 308 bp. cKappa 检测引物是: KV-KC-F(5'-TTCCTGACCGATTCTCTGGCT-3') 和 KV-KC-R(5'-TCAAGAAGCACACGACTGAGG-3'), 所得片段长度为 243 bp. 小鼠 β -actin 作为内参基因, 引物是 β -actin-F(5'-GCTGTATTCCCCTCCATCGT-3') 和 β -actin-R(5'-GGATACCTCTCTTGCTCTGG-3'), 所得片段长度为 109 bp.

定量 PCR 使用 SYBR 荧光试剂(Applied Biosystems, 4334973), 在 7900 测序仪(Applied Biosystems, USA) 上进行, 在 Microsoft Excel 中用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法分析数据. 检测目的基因所用引物: csIgDH 为 HC-F(5'-GTGTCCAATACTACTTTGACTACT-3') 和 HC-R(5'-CATTTTCCTCTGGGGCTTTGC-3'), cKappa 为 KC-F(5'-TATTCGGCGGAGGGACCAAG-3') 和 KC-R(5'-CAAGAAGCACACGACTGAGG-3'). 内参基因引物是 β -actin-F(5'-GCTGTATTCCCCTCCATCGT-3') 和 β -actin-R(5'-GGATACCTCTCTTGCTCTGG-3'). 以上引物均由北京生工生物有限公司合成.

1.4 SDS-PAGE 和 Western blotting

转基因和非转基因小鼠眼眶静脉窦取血于 0.5 mL 离心管中, 4℃ 过夜. 4℃, 3500 r/min 离心 15 min, 取上清, 即为血清样品, -80℃ 保存备用. 用 BCA 法(Beyotime, CN) 测血清蛋白浓度. 取血清样品 8 μ g 与 5×SDS 上样溶液混合后, 95℃ 变性 5 min, 10% SDS-PAGE 胶分散蛋白. 1 份用考马斯亮蓝 R250 染色, 1 份用来做 Western blotting. 通过电泳将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜上(Amersham Pharmacia, UK), TBST 洗膜 5 min, 重复 1 次. 5% 脱脂奶粉(TBST 配制) 封闭, 4℃ 过夜. TBST 洗膜 10 min, 重复 2 次. 用 HRP 自标单克隆抗小鼠 IgD 抗体(eBioscience, USA), 浓度为 1:1000(0.5% 封闭液配制), 孵育 1 h. TBST 洗膜 10 min, 重复 3 次. ECL(Amersham Biosciences, UK) 显色, 压 X 光片.

A 转基因结构

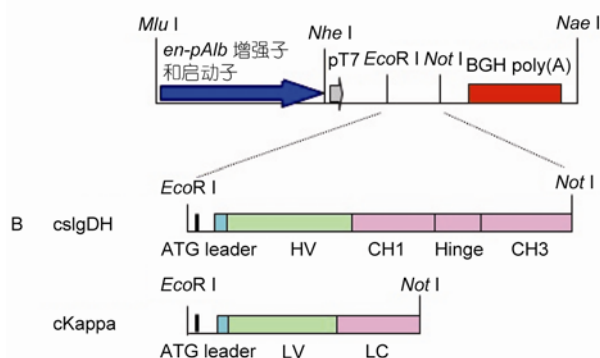


图 1 转基因片段结构及酶切位点

A: 转基因框架结构; B: 插入的目的基因片段

1.5 IgD 酶联免疫吸附实验(ELISA)

小鼠血清 IgD ELISA Kit(BlueGene, CN)使用前在室温放置 30 min. 取出酶标板, 各孔分别加入 100 μ L 标准、样品和空白对照(蒸馏水), 再在各孔加入 50 μ L 的酶标记溶液(不含空白对照); 封膜, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 充分清洗酶标板 5 次, 吸水纸上拍干; 各孔加入显色剂 A, B 液各 50 μ L(不含空白对照); 然后, 20~25 $^{\circ}$ C 下避光反应 15 min 后, 加入 50 μ L 终止液, 终止反应; 30 min 内在波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 A 值, 计算样品 sIgD 的浓度.

1.6 B 细胞发育的流式分析

取同窝同性别转基因小鼠和阴性小鼠, 颈椎脱臼处死, 分离骨髓细胞和脾脏细胞. 骨髓细胞的获得: 取小鼠腿骨, 剥除皮肉, 用 2 mL 注射器吸取 PBS, 插入到骨髓中吹出骨髓于冰上的 50 mL 离心管中. 脾脏细胞的获得: 将脾脏组织放于 200 目的细胞筛上, 淋洒少量 PBS, 用注射器芯挤压组织, 用 PBS 将分散的细胞吹入冰上的 50 mL 离心管中, 加入 2 倍体积的红细胞裂解液(去除红细胞), 混合均匀后冰浴 10 min, 加入 5 倍体积的 PBS 终止反应. 骨髓和脾脏单细胞悬液于 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃上清, 即得骨髓和脾脏细胞. 加入适量 PBS 重悬细胞, 用血球计数板进行细胞计数.

将骨髓细胞分成 5 管, 1 管空白细胞(不加抗体), 3 管单标(分别加入 PE-Cy5.5-anti-mouse B220, FITC-anti-mouse IgM 和 PE-anti-mouse CD43), 1 管 3 标(加入 3 种抗体). 同样将脾脏细胞也分成 5 管, 1 管空白细胞, 3 管单标(分别加入 PE-Cy5.5-anti-mouse B220, FITC-anti-mouse IgM 和 PE-anti-mouse IgD), 1 管 3 标(加入 3 种抗体). 然后将这 10 管细胞于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min. 以上抗体用量参见 eBioscience 使用说明. PBS 洗 2 次, 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min. 最后加 150 μ L PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪(MOFLO High-performance cell sorter, Dako)进行分析.

1.7 转基因整合的 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)

从转基因片段的 3'端设计 3 个转基因特异引物: tgp1 位于 cKC 的(5'-GAGCAGCACCTCACATT-3')或位于 csIgDHC 的(5'-CAGCAAGAGCCTAGCAAT-

3'); tgp2 和 tgp3 位于 BGH pA, 分别为(5'-TGCCAGCCATCTGTTGTT-3') 和 (5'-TCTGAGGCGGAAAGAACC-3'). 所用的随机简并引物: adp 为(5'-NGTCGASWGANAWGAA-3') 或 (5'-AGWGNAGWANCAWAGG-3') 或 (5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'). TAIL-PCR 的第一轮 PCR 反应模版为转基因小鼠的基因组 DNA(0.5~1.0 μ g), 第二和第三轮 PCR 反应的模版分别为第一和第二轮的 PCR 产物(0.65 μ L). 第三轮的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, TIANgel Midi Purification Kit(Tiagen, China)回收纯化, 测序. 然后, 在 NCBI 上进行 BLAST 分析.

2 结果

2.1 转基因小鼠的鉴定

对 F₀ 代 37 只小鼠基因组进行 PCR 检测, 得到 9 只共表达 cIgDH 和 cKappa 的转基因阳性小鼠(鼠号分别为: 3, 4, 5, 6, 7, 12, 15, 24, 37)(图 2A). 此外, 还有 3 只仅为表达 cIgDH 或 cKappa 的单阳性小鼠, 在此未做进一步分析. 对这 9 只小鼠进行 Southern blotting 鉴定, 以重链和轻链全长混合液为探针, 都杂出大小为 1214 和 722 bp 的 2 条带, 进一步证实了这 9 只小鼠为转基因阳性小鼠(图 2B). 其中 7 个转基因家系(12 号死亡, 15 号生病无法传代)与阴性小鼠杂交得到 64 只 F₁ 代小鼠, 其中 26 只为 csIgDH 和 cKappa 双阳性.

2.2 csIgD 在阳性小鼠肝脏中的表达

RT-PCR 定性分析 csIgDH 和 cKappa 在转基因小鼠肝脏中 mRNA 的表达(图 2C), 结果表明 csIgDH 和 cKappa 2 个基因在 8 个转基因家系小鼠(其中 15 和 37 是 F₀ 代, 其余为 F₁ 代)的肝脏中都有转录, 阴性对照小鼠中没有转录, 且持家基因 β -actin 在各个家系中都能扩出 109 bp 的条带. 这说明在 mRNA 水平上, 所转目的基因在各家系阳性小鼠的肝脏中都有表达. 定量 PCR 的结果显示, 目的基因在各个家系转基因小鼠的肝脏中都有不同程度的表达, 且同一个体中, csIgDH 和 cKappa 的表达量也有差异(图 2D).

对不同家系 F₀ 或 F₁ 代 5 只转基因小鼠(F₀6-F₇, F₀15, F₀7-F₁24, F₀37 和 F₀4-F₁50)血清中 sIgD 的表达量

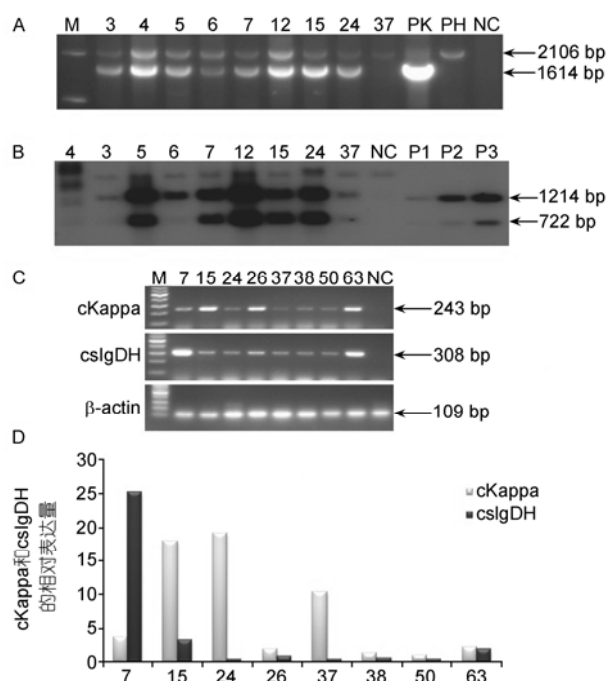


图2 目的基因在转基因小鼠 DNA 及 RNA 水平的鉴定

A: PCR 检测 F₀ 代转基因小鼠; M: 1kb DNA Marker; P: 阳性质粒对照; NC: 阴性对照; 转基因鼠号: 3, 4, 5, 6, 7, 12, 15, 24 和 37; 扩增片段长度: csIgDH 为 2106 bp, cKappa 为 1614 bp. B: 转基因小鼠的 Southern Blotting 分析; 转基因 F₀ 代小鼠基因组酶切消化后, 以重链和轻链全长混合的 PCR 产物为探针进行杂交. NC: 非转基因小鼠做阴性对照; P1, P2, P3 分别相当于 1, 5, 10 基因拷贝的阳性质粒对照. C: RT-PCR 检测目的基因在转基因小鼠肝脏组织中的表达, 所检测的为外源嵌合基因; M: 100 bp DNA Marker; 转基因小鼠是: F₀6-F₀7, F₀15, F₀7-F₀24, F₀3-F₀26, F₀37, F₀5-F₀38, F₀4-F₀50 和 F₀24-F₀63; NC: 非转基因小鼠. β -actin 基因为内参对照. D: 各家系转基因小鼠肝脏中目的基因表达的定量 PCR 检测

进行 Western blotting 分析, 得到分子量大小约为 46 kD 的 sIgDH 目的条带(图 3A 上). 以 F₀37 血清为阳性对照(PC), 对 F₀37 及两只同龄阴性小鼠肝脏和脾脏总蛋白进行 Western blotting 检测, 其中 F₀37 肝脏、脾脏、血清及阴性小鼠脾脏都能得到分子量约为 46 kD 的 sIgDH 目的条带, 而阴性小鼠肝脏没有目的条带(图 3B 上). 结果表明, 各家系转基因小鼠血清中 sIgD 的含量较阴性小鼠都有所的提高. 此外, 对这几只转基因小鼠血清进行 ELISA 检测的结果, 与 Western blotting 结果是一致的(图 3C).

2.3 转基因小鼠 B 细胞的发育

随机选取转基因小鼠 F₀4-F₀81 和同窝同性别阴

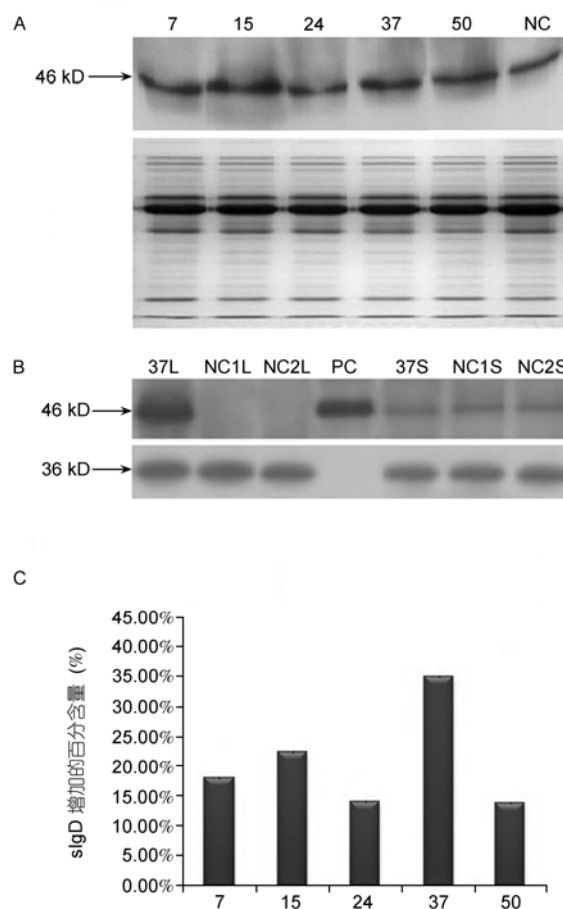


图3 转基因小鼠血清中 sIgD 的 Western blotting 和 ELISA 检测

A: 上图为 5 只转基因小鼠(F₀6-F₀7, F₀15, F₀7-F₀24, F₀37 和 F₀4-F₀50) 血清 sIgD 的 Western blotting 检测; 下图为上图 5 只转基因和 1 只阴性小鼠(NC)的 PAGE 胶对照, 用来说明上样量的一致性; B: 上图 F₀37 和两只同龄阴性小鼠肝脏和脾脏 sIgD 的 Western blotting 检测; F₀37L, NC1L 和 NC2L: 分别为 F₀37, NC1 和 NC2 肝脏; PC: F₀37 血清; F₀37S, NC1S 和 NC2S: 分别为 F₀37, NC1 和 NC2 脾脏. 下图为上图对应样品 GAPDH(36 kD)的 Western blotting 检测. C: 以上 5 只转基因小鼠血清 sIgD 的 ELISA 检测. 纵坐标为转基因阳性小鼠血清 sIgD 含量较 NC sIgD 增加的百分数(NC sIgD 为 7 只同龄的非转基因阴性小鼠血清 sIgD 含量的平均数), 横坐标为不同家系转基因鼠号

性小鼠(NC), 对其骨髓和脾脏单细胞进行流式分析. 结果表明, 转基因小鼠骨髓各发育阶段 B 细胞: pro-B (B220⁺CD43⁺IgM⁻), pre-B(B220⁺CD43⁺IgM⁻)和 immature B(B220⁺CD43⁺IgM⁺)和脾脏成熟 B 细胞(B220⁺IgD⁺-IgM⁺)占总细胞数的比例较阴性小鼠没有显著变化(图 4). 这说明转基因 sIgD 的表达对 B 细胞的发育没有影响.

2.4 转基因片段在染色体上的整合分析

对 F₀6-F₁7, F₀7-F₁18 和 F₀4-F₁50 3 只转基因小鼠的转基因片段进行 genome walking 检测, 结果显示, 这 3 只小鼠的转基因片段分别整合在 14, 13 和 1 号染色体上, 并且附近没有预测到功能基因. 这说明, 转基因片段并未破坏位于 5 号染色体的 *MVK* 基因.

此外, 对高表达 sIgD 的转基因家系小鼠 F₀15, F₀7, F₀4 和 F₀37 进行形态观察, 发现这些小鼠都出现了皮肤溃烂的病变. 病理解剖学观察为肝、脾和肾肿大, 分别是同龄非转基因小鼠的 2.5~3.3, 4.4~6 和 2.7~3.3 倍(图 5A). 对这些病症器官进行组织切片和 HE 染色分析发现, 这些组织中出现了大量的细胞坏死和纤维样蛋白沉淀(图 5B).

3 讨论

由于 sIgD 在血清中的含量低, 半衰期短, 曾一

度被认为没有功能. 近些年, HIDS 的频繁报道^[22-25], 使研究者们将目光再次转向 IgD. 但具体 sIgD 在 HIDS 中的作用是什么还不清楚, 稳定高表达 sIgD 小鼠模型的构建有利于这方面的研究. 本研究证明, csIgD 能够在 ALB 的增强子和启动子的调控下实现在小鼠肝脏中的表达. 小鼠 p-ALB 含有 6 个顺式作用元件^[20], 能够结合肝细胞核因子 1(HNF1)、CCAAT 增强结合蛋白(C/EBP)、p-ALB 的 D 位点结合蛋白(DBP)、亮氨酸氨基酰胺酶(LAP)、核因子 Y(NF-Y)和 NF-1, 所以能有效的启动基因在肝脏中的转录^[26,27]. 此外, 研究发现位于上游-10.4~-8.5 kb 的增强子, 能够增强启动子活性的 50 倍^[28-30]. 虽然各个转基因家系小鼠 sIgD 的表达没有显著提高, 但都有不同程度的增加. 另外, 同时含有重链和轻链的转基因小鼠在与阴性小鼠杂交的后代中出现单链转基因阳性鼠, 这可能与两个目的片段在染色体上随机整合的位置表达相斥有关, 如在减数分裂过程中, 分配到不同的配子中, 但大部分转基因家系小鼠都能把两条链传

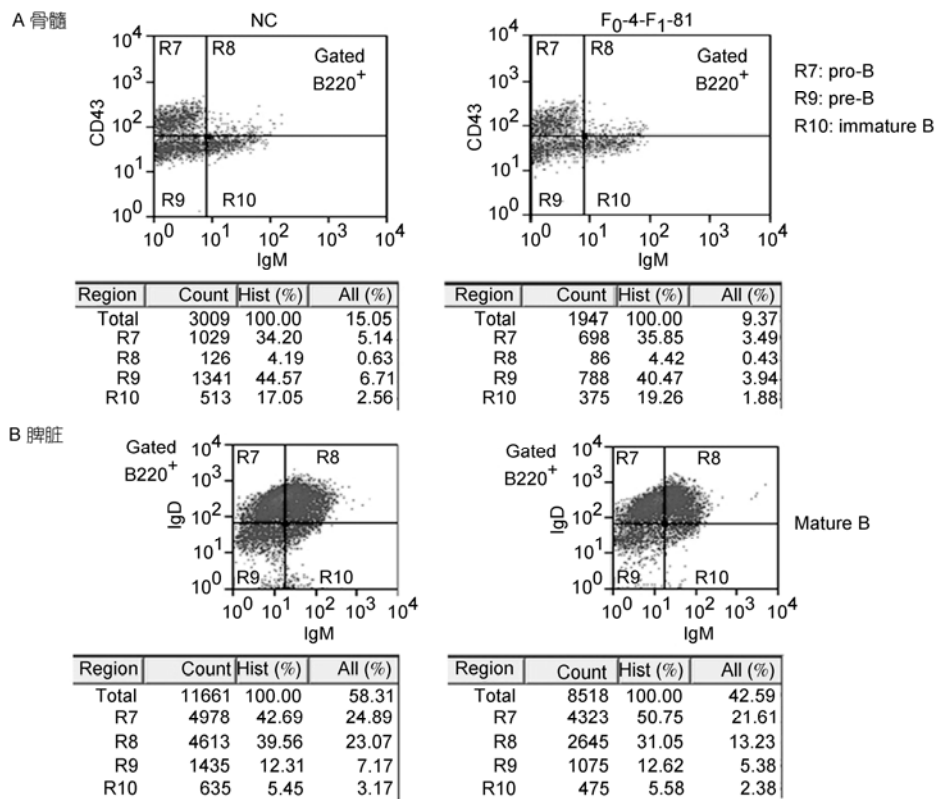


图 4 转基因小鼠和非转基因阴性小鼠骨髓和脾脏 B 细胞的 FACS 分析

A: 转基因小鼠和非转基因阴性小鼠骨髓各个发育阶段 B 细胞(pro-B, pre-B 和 immature B)的 FACS 分析; B: 转基因小鼠和非转基因阴性小鼠脾脏 B 细胞(mature B)的 FACS 分析; F₀4-F₁81: 转基因小鼠, NC: 非转基因阴性小鼠

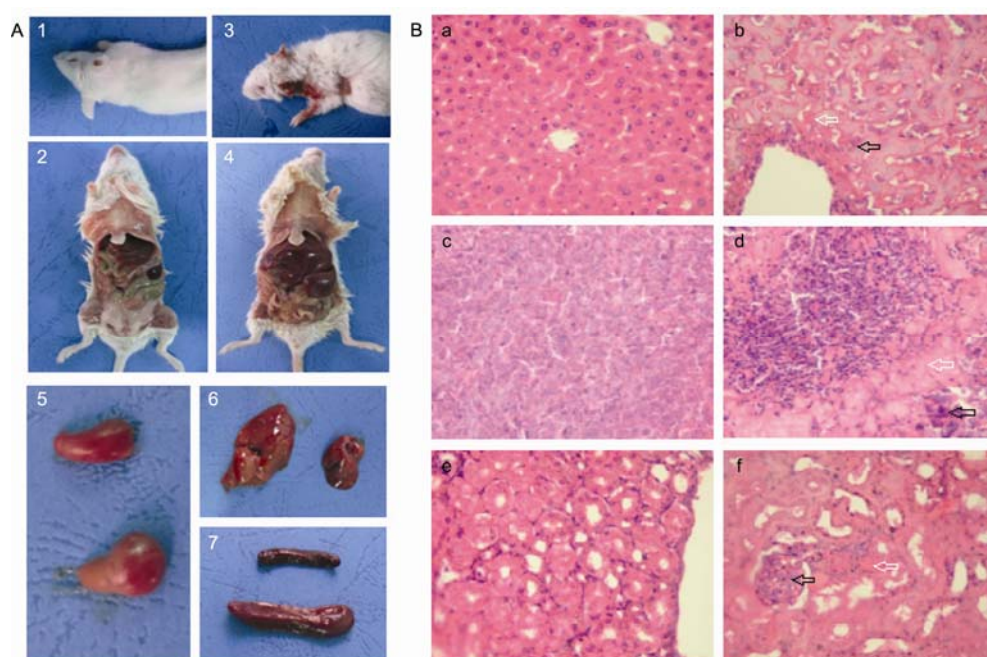


图 5 致病小鼠的形态观察及病理组织切片

1, 2 和 3, 4 分别为阴性和转基因小鼠外形及解剖图; 5, 6 和 7 为这 2 个小鼠的肾脏、肝脏和脾脏大小对比图; 5 上、6 右和 7 上为阴性小鼠的肾脏、肝脏和脾脏, 5 下、6 左和 7 下为转基因小鼠的肾脏、肝脏和脾脏; a, c 和 e 为阴性小鼠的肝脏、脾脏和肾脏组织切片图, b, d 和 f 为转基因小鼠的肝脏、脾脏和肾脏组织切片图. 白色箭头: 纤维样蛋白沉积; 黑色箭头: 坏死细胞

递到后代, 这与以前报道的显微共注射片段能够整合到一起, 插入到染色体的一个位置相一致^[31,32].

从 sIgD 的表达来看, 基因的拷贝数并不和基因的表达量成正比, 这与前人的研究相吻合, 说明转基因的整合位点比转基因的拷贝数更能影响基因的表达^[33]. Western blotting 和 ELISA 结果显示, 转基因家系小鼠 F₀6-F₁7, F₀15, F₀7-F₁24, F₀37 和 F₀4-F₁50 血清中抗体分子 sIgD 的含量是较阴性非转基因小鼠有所升高, 但增加并不明显, 最多增加 35%. 而 Hager 对 MVK 基因的单敲, 却能够实现血清中 sIgD 升高 9~12 倍^[12]. 此外, 我们把目的基因直接插入到 pcDNA3.1(+) 的多克隆位点, 构建了广谱高表达 sIgD 转基因小鼠模型, 在 RNA 水平上, 此小鼠各个组织(心、肝、脾、肺、肾、肠、脑、肌)中都检测到了目的基因片段的表达, 但在蛋白质水平上还是检测不到 sIgD 的高表达(未发表结果). 出现这个问题的可能原因有以下 3 个方面: 一是 csIgD 分子的可变区是人源 IgG1 的可变区, 这可能影响分子的空间结构, 致使小鼠 sIgD 抗体检测出的大部分抗体是小鼠内源的 sIgD; 二是本研究所构建的抗体分子的轻链是 kappa

链, 而通常分泌型的 IgD 利用 lamda 轻链^[34,35], 跨膜型的 IgD 使用 kappa 轻链^[36,37], 这可能又会影响到 sIgD 分子的分泌, 致使所转基因抗体很少被检测到; 最后, 虽然 sIgD 的高表达使其在血清中的浓度升高, 但是机体又通过某种保护机制迅速使其降解, 致使我们无法检测到血清中 sIgD 增加. 所以我们需要对 sIgD 没能实现稳定高表达的原因做进一步研究.

血清 IgD 是 B 细胞激活的初期标志, 还参与记忆 B 细胞的产生及维持, 可能在诱导 B 细胞耐受敏感应答中起着重要的作用, 所以血清中 sIgD 的升高会不会影响到 B 细胞的发育呢? 对转基因小鼠 F₀4-F₁81 骨髓和脾脏细胞流式分析的结果表明, 转基因小鼠 B 细胞发育的各个时期(pro-B, pre-B, immature B 和 mature B)中的 B 细胞占总细胞数的比例与阴性非转基因小鼠没有区别, 说明转基因未影响到 B 细胞的发育.

此外, 通过 genome walking 对 F₀6-F₁7, F₀7-F₁18 和 F₀4-F₁50 3 只转基因小鼠中目的基因片段在染色体上的整合进行检测, 序列比对显示, 这 3 只小鼠的转基因片段分别整合在 14, 13 和 1 号染色体上, 并预

测到转基因片段附近没有功能基因, 这说明不会破坏体内正常基因的表达. 并且转基因片段都没整合到 5 号染色体上, 表明没有破坏 *MVK* 基因. 这说明这些小鼠出现炎症反应与 *MVK* 基因无关, 可能是 *sIgD* 的升高所引起. 并且, 研究表明 *sIgD* 具有促炎症反应的功能, 能够有效的诱导抗菌的免疫刺激的和促炎症因子的产生, 如 *IL-1 β* , *TNF*, *IL-8* 和 *CXCL10*^[38]. 黏膜 *IgD* 能够通过上皮细胞的转运增强局部的免疫力, 而循环的 *IgD* 则通过钙离子驱动的受体绑定于嗜碱性粒细胞上. 除了介导快速的天然免疫反应, *IgD* 还能对入侵的细菌进行免疫信号的传导. 嗜碱性粒细胞结合的 *IgD* 一旦遇到抗原, 并在受 *IgD* 刺激的肥大细胞释放的趋化因子驱动下, 细胞将会迁移到系统或黏膜免疫淋巴器官. 组织中的嗜碱性粒细胞通过释放抗菌因子、调理因子、B 细胞刺

激因子、趋化因子以及促炎症因子等, 以增强免疫保护功能. 但是, 过强的免疫反应会导致病灶的破坏和病变. 在较高表达 *sIgD* 转基因家系小鼠 *F₀15*, *F₀7*, *F₀4* 和 *F₀37* 中, 出现了皮肤溃烂, 可能是 *sIgD* 的高表达引起了过强的免疫激活所致的组织破坏. 此外, 较高表达 *sIgD* 转基因家系小鼠还出现了严重的肝脾肿大和肾肿大的现象, 病理组织切片结果显示各组织中都出现了大量的细胞坏死和纤维样蛋白沉淀, 这与报道的人高 *IgD* 综合症相似^[17,22-25,39]. 对这 4 只疑似高 *IgD* 综合症的小鼠进行传代, 其中 *F₀15* 和 *F₀37* 发病后, 配不上, 故无法传代; *F₀7* 有 2 只阳性后代, 其中 1 只出现皮肤溃烂、肝脾肿大和肾肿大, 而 *F₀4* 有 3 只阳性后代, 其中 2 只出现了皮肤溃烂、肝脾肿大和肾肿大. 但具体是否是高 *IgD* 综合征还需要进一步的验证.

参考文献

- 1 Drenth J P, Prieur A M. Occurrence of arthritis in hyperimmunoglobulinaemia D. *Ann Rheum Dis*, 1993, 52: 765–766
- 2 Drenth J P, Boom B W, Toonstra J, et al. Cutaneous manifestations and histologic findings in the hyperimmunoglobulinemia D syndrome. International Hyper IgD Study Group. *Arch Dermatol*, 1994, 130: 59–65
- 3 Drenth J P, Haagsma C J, van der Meer J W. Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. The clinical spectrum in a series of 50 patients. International Hyper-IgD Study Group. *Medicine (Baltimore)*, 1994, 73: 133–144
- 4 Klasen I S, Goertz J H, van de Wiel G A, et al. Hyper-immunoglobulin A in the hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8: 58–61
- 5 Frenkel J, Rijkers G T, Mandey S H, et al. Lack of isoprenoid products raises *ex vivo* interleukin-1 β secretion in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum*, 2002, 46: 2794–2803
- 6 van der Meer J W, Vossen J M, Radl J, et al. Hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever: a new syndrome. *Lancet*, 1984, 1: 1087–1090
- 7 Drenth J P, Cuisset L, Grateau G, et al. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nat Genet*, 1999, 22: 178–181
- 8 Simon A, Cuisset L, Vincent M F, et al. Molecular analysis of the mevalonate kinase gene in a cohort of patients with the hyper-igd and periodic fever syndrome: its application as a diagnostic tool. *Ann int med*, 2001, 135: 338–343
- 9 Houten S M, van Woerden C S, Wijburg F A, et al. Carrier frequency of the V377I (1129G>A) *MVK* mutation, associated with Hyper-IgD and periodic fever syndrome, in the Netherlands. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11: 196–200
- 10 Aringer M. Periodic fever syndromes—a clinical overview. *Acta Med Austriaca*, 2004, 31: 8–12
- 11 Drenth J P, van der Meer J W. Hereditary periodic fever. *New Eng j med*, 2001, 345: 1748–1757
- 12 Hager E J, Tse H M, Piganelli J D, et al. Deletion of a single mevalonate kinase (*Mvk*) allele yields a murine model of hyper-IgD syndrome. *J Inherit Metab Dis*, 2007, 30: 888–895
- 13 Ammouri W, Cuisset L, Rouaghe S, et al. Diagnostic value of serum immunoglobulinaemia D level in patients with a clinical suspicion of hyper IgD syndrome. *Rheumatology*, 2007, 46: 1597–1600
- 14 Dikeacou T C, van Joost T, Cormane R H. The recruitment of inflammatory cells using the skin-window technique. *Arch Dermatol Res*, 1979, 265: 1–7
- 15 Chen K and Cerutti A. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol Rev*, 2010, 237: 160–179
- 16 Vladutiu A O. Immunoglobulin D: properties, measurement, and clinical relevance. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, 7: 131–140
- 17 Naruto T, Nakagishi Y, Mori M, et al. Hyper-IgD syndrome with novel mutation in a Japanese girl. *Mod Rheumatol*, 2009, 19: 96–99

- 18 Yoshimura K, Wakiguchi H. Hyperimmunoglobulinemia D syndrome successfully treated with a corticosteroid. *Pediatr Int*, 2002, 44: 326–327
- 19 Gorski K, Carneiro M, and Schibler U Tissue-specific *in vitro* transcription from the mouse albumin promoter. *Cell*, 1986, 47: 767–776
- 20 Herbomel P, Rollier A, Tronche F, et al. The rat albumin promoter is composed of six distinct positive elements within 130 nucleotides. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 4750–4758
- 21 Heard J M, Herbomel P, Ott M O, et al. Determinants of rat albumin promoter tissue specificity analyzed by an improved transient expression system. *Mol Cell Biol*, 1987, 7: 2425–2434
- 22 Kraus C L, Culican S M. Nummular keratopathy in a patient with Hyper-IgD Syndrome. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2009, 7: 14
- 23 Sornsakrin M, Wenner K, Ganschow R B. cell cytopenia in two brothers with hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Eur J Pediatr*, 2009, 168: 825–831
- 24 Attout H, Guez S, Ranaivo I, et al. A patient with hyper-IgD syndrome responding to simvastatin treatment. *Eur J Intern Med*, 2008, 19: e82–83
- 25 Coban E, Terzioğlu E A. patient with hyper-IgD syndrome in Antalya, Turkey. *Clin Rheumatol*, 2004, 23: 177–178
- 26 Tronche F, Rollier A, Bach I, et al. The rat albumin promoter: cooperation with upstream elements is required when binding of APF/HNF1 to the proximal element is partially impaired by mutation or bacterial methylation. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 4759–4766
- 27 Zhang D E, Ge X, Rabek J P, et al. Functional analysis of the trans-acting factor binding sites of the mouse alpha-fetoprotein proximal promoter by site-directed mutagenesis. *J biol chem*, 1991, 266: 21179–21185
- 28 Izban M G, Papaconstantinou J. Cell-Specific expression of mouse albumin promoter-evidence for cell-specific DNA elements within the proximal promoter region and cis-acting DNA elements upstream of-160. *J biol chem*, 1989, 264: 9171–9179
- 29 Pinkert C A, Ornitz D M, Brinster R L, et al. An albumin enhancer located 10-kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Gene Dev*, 1987, 1: 268–276
- 30 Hu J M, Camper S A, Tilghman S M, et al. Functional analyses of albumin expression in a series of hepatocyte cell lines and in primary hepatocytes. *Cell Growth Differ*, 1992, 3: 577–588
- 31 Clark A J, Cowper A, Wallace R, et al. Rescuing transgene expression by co-integration. *Biotechnology (NY)*, 1992, 10: 1450–1454
- 32 Tang B, Yu S, Zheng M, et al. High level expression of a functional human/mouse chimeric anti-CD20 monoclonal antibody in milk of transgenic mice. *Transgenic Res*, 2008, 17: 727–732
- 33 Enjuanes L, Sola I, Castilla J, et al. Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk. *J Virol*, 1998, 72: 3762–3772
- 34 Fine J M, Rivat C, Lambin P, et al. Monoclonal IgD. A comparative study of 60 sera with IgD “M” component. *Biomedicine*, 1974, 21: 119–125
- 35 Fibbe W E, Jansen J. Prognostic factors in IgD myeloma: a study of 21 cases. *Scand J Haematol*, 1984, 33: 471–475
- 36 Rowe D S, Hug K, Forni L, et al. Immunoglobulin-D as a Lymphocyte Receptor. *J Exp Med*, 1973, 138: 965–972
- 37 Ligthart G J, Schuit H R, Hijmans W. Subpopulations of mononuclear cells in ageing: expansion of the null cell compartment and decrease in the number of T and B cells in human blood. *Immunology*, 1985, 55: 15–21
- 38 Chen K, Xu W, Wilson M, et al. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol*, 2009, 10: 889–898
- 39 Obici L, Manno C, Muda A O, et al. First report of systemic reactive (AA) amyloidosis in a patient with the hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum*, 2004, 50: 2966–2969